



UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Wydział Farmaceutyczny

Monika Małgorzata Ołdakowska

Analiza związku pomiędzy stężeniem Cu, Zn a polimorfizmem genów izoform metalotioneiny oraz dysmutazy nadadtlenkowej u osób zdrowych oraz pacjentów z ostrym stanem zapalnym trzustki.

Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Biomedycznych
Analiz Środowiskowych

Promotor: Prof. dr hab. Halina Milnerowicz

Promotor pomocniczy: Dr Milena Ściskalska

Wrocław 2021

STRESZCZENIE PRACY

Trzustka jest narządem posiadającym słabo rozwinięty system antyoksydacyjny. Spadek stężenia Zn w porównaniu do miedzi skutkuje nasileniem stresu oksydacyjnego i działaniem prozapalnym. Obserwowany stres oksydacyjny w przebiegu stanu zapalnego tego narządu jest dodatkowo potęgowany przez wolne rodniki dymu tytoniowego. Neutralizacja stresu oksydacyjnego zależy od funkcjonowania antyoksydantów, takich jak MT i SOD, które działanie jest zależne od homeostazy Cu i Zn. Zmiany w genach kodujących MT oraz SOD mogą wpływać również na stężenie Cu i Zn w trzustce. Zatem, w niniejszej pracy przeprowadzono następujące badania:

- 1) zbadano stężenie hs-CRP i IL-6 jako markerów stanu zapalnego,
- 2) oznaczono stężenie malondialdehydu (MDA) jako markera stresu oksydacyjnego,
- 3) zbadano poziom niskocząsteczkowych antyoksydantów – TAC,
- 4) oznaczono stężenie metali: Cu, Zn i Cd,
- 5) oznaczono stężenie MT1/2 jako białka wiążącego metale (Cu, Zn, Cd),
- 6) zmierzono stężenia i aktywności izoenzymów SOD.

W niniejszej pracy podjęto także próbę oceny wpływu polimorfizmów: rs11640851 w genie MT1A, rs964372 w genie MT1B, rs10636 w genie MT2A na stężenie Cu, Zn, MT oraz aktywność całkowitą SOD. Ponadto, dokonano analizy wpływu SNP rs2070424 w genie SOD1 na stężenie Cu, Zn oraz stężenie i aktywność izoenzymów SOD (SOD1, SOD2, SOD3). Wyżej wymienione parametry były oznaczane w środowisku wewnątrzkomórkowym (lizat erytrocytarny) i zewnątrzkomórkowym (osocze).

Materiałem badanym była krew żylna pobrana od 92 osób zdrowych w wieku 20-30 lat, 51 osób zdrowych w wieku 30-70 lat oraz 40 pacjentów z OZT.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (nr KB 215/2020, KB 529/2018 oraz KB 592/2013). Badaną populację podzielono ze względu na płeć oraz ekspozycję na ksenobiotyki dymu tytoniowego, którą zweryfikowano przez oznaczenie stężenia kotyniny we krwi – metabolitu nikotyny.

W grupie zdrowych kobiet zaobserwowano niższe stężenie Zn oraz wzrost wartości współczynnika Cu/Zn w porównaniu do mężczyzn. We krwi osób w wieku 30-70 lat odnotowano znacznie wyższe stężenie kadmu w porównaniu do osób w wieku 20-30 lat. Dodatkowo, w grupie osób zdrowych (zarówno w wieku 20-30 jak i 30-70 lat) oraz pacjentów z OZT narażonych na ksenobiotyki dymu tytoniowego wykazano wzrost stężenia kadmu w porównaniu do osób nienarażonych. We krwi palących osób zdrowych w wieku 20-30 lat oraz pacjentów z OZT zaobserwowano niższe stężenie Zn w porównaniu z osobami niepalącymi. W grupie pacjentów z OZT wykazano wzrost stężenia Cu, spadek stężenia Zn oraz wzrost wartości współczynnika Cu/Zn w porównaniu do osób zdrowych. Ponadto, we krwi pacjentów z OZT wykazano wzrost stężenia markerów stanu zapalnego, takich jak hs-CRP i IL-6 oraz zwiększone stężenie MDA, jako markera stresu oksydacyjnego, oraz wartości TAC w porównaniu do osób zdrowych. W lizacie erytrocytarnym pacjentów z OZT zaobserwowano wyższe stężenia MT, SOD2 i zwiększoną aktywność Mn-SOD w porównaniu do osób zdrowych w wieku 30-70 lat. Ponadto, w osoczu pacjentów z OZT odnotowano wzrost stężenia SOD1 i niższe stężenia SOD2 i SOD3 w zestawieniu z osobami zdrowymi. Dodatkowo wykazano niższą aktywność Mn-SOD, SODs i Cu/Zn- SOD w osoczu pacjentów z OZT w porównaniu do osób zdrowych.

We krwi palących pacjentów z OZT z genotypem CA zaobserwowano niższe stężenie Zn w porównaniu do pacjentów z genotypami AA i CC dla SNP rs11640851

w genie *MT1A*. Ponadto, zaobserwowano wyższe stężenie Cd we krwi osób zdrowych z genotypem AA w porównaniu do osób z genotypami CA i CC dla wyżej wymienionego polimorfizmu. Dodatkowo odnotowano wyższe stężenia Cu i Cd we krwi zdrowych kobiet z genotypem AA w porównaniu do kobiet z genotypem CA i CC dla SNP rs11640851 w genie *MT1A*. Analiza polimorfizmu rs964372 w genie *MT1B* wykazała wyższe stężenie MT w lizacie erytrocytarnym osób zdrowych z genotypem GG w porównaniu do osób z tej grupy z genotypem CC. Ponadto, odnotowano niższe stężenie Zn we krwi palących pacjentów z OZT z genotypem GC, czemu towarzyszyło wyższe stężenie hs-CRP w porównaniu do palących pacjentów z genotypem CC dla polimorfizmu rs10636 w genie *MT2A*. Zaobserwowano wzrost stężenia MT w lizacie erytrocytarnym pacjentów z OZT z genotypem GG w porównaniu do osób z tej grupy z genotypem CC dla SNP rs10636 w genie *MT2A*. Wykazano zwiększoną aktywność całkowitą SOD oraz Cu/Zn SOD w osoczu w grupie osób zdrowych z genotypem AG w porównaniu do osób z genotypem AA dla SNP rs2070424 w genie *SOD1*.

Podsumowując, w niniejszej pracy wykazano, że wraz z wiekiem obserwuje się wzrost kumulacji kadmu w organizmie. Wzrost stężenia Cd, którego źródłem jest narażenie na ksenobiotyki dymu tytoniowego przyczynia się do spadku stężenia Zn oraz wzrostu wartości współczynnika Cu/Zn. Przebieg OZT jest związany z zaburzeniem homeostazy Zn i Cu, co skutkuje wzrostem współczynnika Cu/Zn i nasileniem procesu zapalnego. Znaczący wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia SOD1 w osoczu pacjentów z OZT dowodzi istotnej roli tego izoenzymu w neutralizacji stresu oksydacyjnego wywołanego przez zaburzenie homeostazy Cu i Zn. Obecność zwiększonego stężenia MT i SOD2 w erytrocytach pacjentów z OZT w porównaniu do osób zdrowych potwierdza ważną funkcję tych antyoksydantów w obronie antyoksydacyjnej. Osoby zdrowe oraz pacjenci z OZT z genotypem AA w genie *MT1A* dla SNP rs11640851 są najbardziej

wrażliwi na działanie ksenobiotyków dymu tytoniowego, o czym świadczy wzrost stężenia Cd we krwi. Występowanie genotypu CA w genie *MT1A* dla SNP rs11640851 odgrywa ważną rolę w zaburzeniu homeostazy Zn u pacjentów z OZT, zwłaszcza palących papierosy. Polimorfizm rs964372 w genie *MT1B* jest związany ze wzrostem stężenia MT w lizacie erytrocytarnym pacjentów z OZT z genotypem GG. Obecność genotypu GC dla SNP rs10636 w genie *MT2A* predysponuje do znacznego obniżenia stężenia Zn w osoczu palących pacjentów z OZT, co przyczynia się do nasilenia procesów prozapalnych. Obecność genotypu AG dla SNP rs207024 w genie *SOD1* w grupie osób zdrowych jest związana ze wzrostem aktywności całkowitej SODs ($SOD1+SOD2+SOD3$) oraz Cu/Zn-SOD ($SOD1+SOD3$) w osoczu. Badane polimorfizmy rs11640851 w genie *MT1A*, rs964372 w genie *MT1B*, rs10636 w genie *MT2A* oraz rs2070424 w genie *SOD1* wydają się być istotnym czynnikiem w utrzymaniu homeostazy organizmu w warunkach zwiększonego narażenia na stres oksydacyjny.

Abstract

The pancreas is an organ with a poor antioxidant system. The decrease in Zn concentration and increased Cu level result in an intensification of oxidative stress and a pro-inflammatory effect. The oxidative stress in the course of pancreatitis is additionally exacerbated by free radicals induced by the exposure to tobacco smoke xenobiotics. The neutralization of oxidative stress is depended on the functioning of antioxidants, such as MT and SOD, which the antioxidant effects are associated with Cu and Zn homeostasis. Changes in the genes encoding MT and SOD can also have an influence on the Cu and Zn concentrations in the pancreas. Thus, in this study the following determinations were carried out:

- 1) the concentration of hs-CRP and IL-6 as markers of inflammation,
- 2) the concentration of malondialdehyde (MDA) as a marker of oxidative stress,
- 3) the level of low molecular weight antioxidants - TAC,
- 4) the concentration of metals: Cu, Zn and Cd,
- 5) the concentration of MT1/2 as a metal binding protein (Cu, Zn, Cd),
- 6) the concentrations and activities of SOD isoenzymes.

In this study, the influences of polymorphisms: rs11640851 in the MT1A gene, rs964372 in the MT1B gene, rs10636 in the MT2A gene on the concentration of Cu, Zn, MT and total SOD activity were also assessed. Moreover, the influence of SNP rs2070424 in the SOD1 gene on the concentration of Cu, Zn and the concentrations and activities of SOD isoenzymes (SOD1, SOD2, SOD3) were analyzed. The above-mentioned parameters were determined in the intracellular (erythrocyte lysate) and extracellular (plasma) environment.

The biological material was venous blood collected from 92 healthy subjects in aged 20-30, 51 healthy people in aged 30-70 and 40 the patients with acute pancreatitis

(AP). The research was approved by the Bioethics Committee of the Wrocław Medical University (no. KB 215/2020, KB 529/2018 and KB 592/2013). The study population was divided according to gender and exposure to tobacco smoke xenobiotics, what was verified by determining the blood concentration of cotinine - a nicotine metabolite.

In the group of healthy women, a lower Zn concentration and higher value of the Cu/Zn ratio compared to healthy men was observed. In the blood of people in aged 30-70, the Cd concentration was significantly higher compared to people in aged 20-70. Additionally, in the group of smoking healthy subjects (in both, 20-30 and 30-70 years old) and AP patients, an increase in Cd concentration compared to non-smokers was shown. A lower Zn concentration was observed in the blood of smoking healthy subjects in aged 20-30 and AP patients compared to non-smokers. In the group of AP patients, an increase in Cu concentration, a decrease in Zn concentration and an increased the value of the Cu/Zn ratio compared to healthy subjects were demonstrated. Moreover, in the blood of AP patients compared to healthy subjects an increase in the concentrations of inflammatory markers, such as hs-CRP and IL-6, an increase in MDA concentration - a marker of oxidative stress, and an increase in the value of TAC were shown. In the erythrocyte lysate of AP patients were observed a higher concentrations of MT and SOD2 and increased Mn-SOD activity compared to healthy subjects in aged 30-70. Moreover, in the plasma of AP patients, an increase in the SOD1 concentration and lower concentrations of SOD2 and SOD3 in comparison with healthy subjects were noticed. Additionally, it was shown a lower activity of Mn-SOD, SODs and Cu/Zn-SOD in the plasma of AP patients compared to healthy subjects.

In the blood of smoking AP patients with the CA genotype, a lower concentration of Zn compared to the AP patients with the AA and CC genotypes for the rs11640851 SNP in the MT1A gene was observed. Moreover, in the blood of healthy subjects with

the AA genotype was observed higher Cd concentration compared to those with the CA and CC genotypes for this polymorphism. Additionally, an increased Cu and Cd concentrations in the blood of healthy women with the AA genotype compared to women with the CA and CC genotype for the rs11640851 SNP in the MT1A gene were noted. The analysis of the SNP rs964372 in the MT1B gene was shown an elevated MT concentration in the erythrocyte lysate of healthy subjects with the GG genotype compared to those with the CC genotype. In addition, it was noted a decrease in the Zn concentration accompanied by a higher hs-CRP concentration in the blood of smoking AP patients with the GC genotype compared to smoking AP patients with the CC genotype for the rs10636 polymorphism in the MT2A gene. An increase in MT concentration in the erythrocyte lysate of patients with AP with the GG genotype in comparison to those with the CC genotype for the rs10636 SNP in the MT2A gene was shown. In group of healthy subjects with the AG genotype were demonstrated an increased plasma total SOD activity and Cu/Zn-SOD activity compared to healthy subjects with the AA genotype for SNP rs2070424 in the SOD1 gene.

In conclusion, in this study was shown that Cd accumulation in the organism increases with the age. An increase in the Cd concentration, the source of that is exposure to tobacco smoke xenobiotics, contributes to the decrease in the Zn concentration and an increase in the value of the Cu/Zn ratio. The course of acute pancreatitis is related to the disturbance of Zn and Cu homeostasis, which results in an increase in the Cu/Zn ratio and the intensification of inflammatory process. The significant increase in the intracellular SOD1 concentration in the plasma of AP patients proves the important role of this isoenzyme in the neutralization of oxidative stress caused by the disturbance of Cu and Zn homeostasis. The presence of an increased concentration of MT and SOD2 in the erythrocytes of AP patients compared to healthy subjects confirms the important role

of these antioxidants in the antioxidant defense. Healthy subject and AP patients with the AA genotype in the MT1A gene for SNP rs11640851 are the most sensitive to the toxic effects of tobacco smoke xenobiotics, as evidenced by the increase in the blood Cd concentration. The presence of the CA genotype in the MT1A gene for SNP rs11640851 plays an important role in the disturbance of Zn homeostasis, especially in the group of smoking AP patients. The SNP rs964372 in the MT1B gene is associated with the increased MT concentration in the erythrocyte lysate of AP patients with the GG genotype. The presence of the GC genotype for SNP rs10636 in the MT2A gene predisposes to a significant decrease in the plasma Zn concentration in the group of smoking AP patients, which contributes to the intensification of pro-inflammatory processes. The presence of the AG genotype for SNP rs207024 in the SOD1 gene in the group of healthy subject is associated with an increase in the total activity of SODs (SOD1 + SOD2 + SOD3) and Cu/Zn-SOD (SOD1 + SOD3) in plasma. The investigated polymorphisms: rs11640851 in the MT1A gene, rs964372 in the MT1B gene, rs10636 in the MT2A gene and rs2070424 in the SOD1 gene seem to be an important factor in maintaining the homeostasis of organism during oxidative stress conditions.